وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشکده فنی مهندسی

مطالعه اثر نانو ذرات بر القا تولید آرتمیزنین و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آن در کشت سوسپانسیون چند گونه درمنه

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی

گرایش کشاورزی

بی‌تا قاسمی

اساتید راهنما:

دکتر رامین حسینی

دکتر فاطمه دهقان نیری

اسفند ۱۳۹۱

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه بین المللی امام خمینی

IMAM KHOMEINI INTERNATIONAL UNIVERSITY

دانشکده فنی مهندسی

گروه بیوتکنولوژی

مطالعه اثر نانو ذرات بر القا تولید آرتمیزنین و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آن در کشت سوسپانسیون چند گونه درمنه

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته‌ی بیوتکنولوژی

گرایش کشاورزی

بی‌تا قاسمی

اساتید راهنما:

دکتر رامین حسینی

دکتر فاطمه دهقان نیری

اسفند ۱۳۹۱

به نام خداوند تمام شگفتی‌ها

تقدیم به

مادرم

که ترنم صدایش باشکوه‌ترین ترانه عشق و امید را در گوشم زمزمه می‌کند و نگاه پر مهرش تنها دلگرمی قلب و پشتیبان راهم است. اوکه معنای واقعی اراده است و نگذاشت هیچ گاه به باورهایم شک کنم.

پدرم

که لذت دوست داشتن را به من آموخت.

برادرم

که هیچ گاه تنهایم نگذاشت.

دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

معاونت آموزشی – مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم تاییدیه‌ی هیأت داوران جلسه‌ی دفاع از پایان‌نامه/رساله

بدین وسیله گواهی میشود جلسه دفاعیه از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی رشته بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی تحت عنوان مطالعه اثر نانو ذرات بر القاء تولید آرتمیزنین و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آن در کشت سوسپانسیون چند گونه درمنه در تاریخ ۱۳۹۱/۱۲ /۲۰ در دانشگاه برگزار گردید و این پایان نامه با نمره ۱۹/۴۵ و درجه عالی مورد تایید هیئت داوران قرار گرفت.

ردیف	سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبه‌ی دانشگاهی	دانشگاه یا مؤسسه	امضا
۱	استاد راهنما	دکتر رامین حسینی	استادیار	دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)	
۲	استاد راهنما دوم	دکتر فاطمه دهقان نیری	استادیار	دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)	
۳	داور داخلی	دکتر قاسمعلی گروسی	استادیار	دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)	

نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد جباری	مهر و امضا

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب بی‌تا قاسمی دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی که در تاریخ ۹۱/۱۲/۲۰ از پایان نامه ی خود تحت عنوان مطالعه اثر نانو ذرات بر القاء تولید آرتمیزنین و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آن در کشت سوسپانسیون چند گونه درمنه با کسب درجه ی عالی دفاع کرده ام، شرعا و قانونا متعهد می شوم:

۱. مطالب مندرج در این پایان نامه، حاصل تحقیق و مطالعه اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده کرده ام، با رعایت کامل امانت ، مطابق مقررات، اقدام به ارجاع در متن و ذکر آن در فهرست منابع و مآخذ نموده ام.
۲. تمامی یا بخشی ازاین پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی به سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
۳. مقالات مستخرج ازاین پایان نامه کاملا حاصل کار اینجانب بوده و از هرگونه جعل داده و یا تغییر اطلاعات پرهیز کرده ام.
۴. از ارسال همزمان و یا تکراری مقالات مستخرج ازاین پایان نامه (با بیش از ۳ درصد همپوشانی) به مجلات و یا همایش های گوناگون خودداری نموده و می نمایم.
۵. کلیه حقوق مادی و معنوی حاصل از این پایان نامه متعلق به دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) بوده و متعهد می شوم هرگونه بهره مندی ویا نشر دستاوردهای حاصل از این تحقیق اعم از چاپ کتاب، مقاله، ثبت اختراع و غیره (چه در زمان دانشجویی و یا بعد از فراغت از تحصیل) با کسب اجازه از استاد (استادان) راهنما باشد.
۶. درصورت اثبات تخلف و نقض موارد پنجگانه فوق (درهر زمان) مدرک تحصیلی صادر شده توسط دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره) از درجه اعتبار ساقط و اینجانب هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام ونام خانوادگی دانشجو

امضاء

سوگندنامه دانش آموختگان کارشناسی ارشد دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

به نام خدا

سپاس ایزد منان را که مرا مشمول الطاف خویش نمود که با طی مراحل تحصیل موفق به اخذ درجه کارشناسی ارشد شوم. به شکرانه این نعمت بزرگ الهی که با امکانات این مرز و بوم، فراهم نزد اینجانب به امانت گذاشته شده است، در پیشگاه ملت ایران به کتاب آسمانی خود، قرآن کریم، سوگند یاد می کنم که :

- در سراسر زندگی حرفه ای، در راه اعتلای کشور ایران و جامعه بشری به نحو احسن قدم برداشته و دراین راه از هیچ تلاشی دریغ ننمایم.
- در تمام فعالیت های تخصصی، رضای خدا را همراه با صداقت علمی و اجتماعی در نظر داشته و از موقعیت های به دست آمده در جهت رفع مشکلات جامعه استفاده کنم و در همه ی امور، منافع کشور را بر منافع فردی مقدم بدارم.
- همواره علم و دانش خود را به روز نگاه داشته و در ایفای مسئولیت و تعهدات حرفه ای در حد توان سعی و تلاش خود را به کار گیرم.
- و اینک از خداوند علیم توفیق بندگی و پای بندی به مفاد این سوگندنامه را خواستارم و از او می خواهم که مرا در ایفای رسالت علمی و انسانی خویش موفق بدارد.

نام ونام خانوادگی دانشجو

امضاء

مجوز بهره برداری از پایان نامه

کلیه حقوق اعم از چاپ، تکثیر، نسخه برداری، ترجمه، اقتباس و ... از نتایج این پایان نامه برای دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره) قزوین محفوظ است. بهره برداری از این پایان نامه/ رساله در چهارچوب مقررات کتابخانه و با توجه به محدودیتی که توسط استاد راهنما به شرح زیر تعیین می شود، بلامانع است:

☐ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله برای همگان بلامانع است.

☐ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله با اخذ مجوز از استاد راهنما، بلا مانع است.

☐ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله تا تاریخ ..... ممنوع است.

نام استاد و یا اساتید راهنما:

تاریخ:

امضاء:

چکیده

گیاه درمنه (*Artemisia annua* L.) به دلیل تولید ترکیباتی از جمله آرتمیزنین و منوترپن‌ها دارای اهمیت ویژه‌ای است. از کاربردهای مهم آرتمیزنین، مقابله با پلاسمودیوم‌های عامل بیماری مالاریا، همچنین درمان انواع گوناگون سرطان و نیز مقابله با ویروس‌هایی مانند عامل هپاتیت B می باشد. خاصیت آللوپاتیک و دورکنندگی حشرات، علف‌کشی و جلبک‌کشی نیز از ویژگی‌های دیگر آرتمیزنین است. تولید اندک آرتمیزنین در گیاه درمنه (کمتر از ۱/۲٪ وزن خشک) باعث شده است که داروهای ساخته شده برای مردم مناطقی که بیماری مالاریا در آن رواج دارد گران تمام شود. در دهۀ اخیر، تلاش‌های زیادی در راستای تولید بیشتر این ماده از طریق مهندسی متابولیک، شناخت بیشتر مسیر بیوسنتزی و ژن‌های دخیل در آن و افزایش میزان بیان آن‌ها با استفاده از الیسیتورهای گوناگون انجام شده است؛ ولی با این وجود، هیچ کدام از این روش‌ها مقرون به صرفه نبوده اند. در این مطالعه از سوسپانسیون سلولی گیاه مذکور جهت بررسی میزان آرتمیزینین و همچنین میزان بیان دو ژن کلیدی *SQS* و *DBR2* درگیر در بیوسنتز این ماده استفاده شد. به این منظور، از غلظت‌های ۰/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و همچنین از غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان در چهار بازه زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال الیسیتور استفاده شد. میزان آرتمیزنین تولیدی با استفاده از HPLC و میزان تغییرات بیان ژن با استفاده از qRT-PCR بررسی شد. بیشترین میزان تولید آرتمیزنین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانو کبالت و بعد از ۲۴ ساعت حاصل شد. در تیمار فوق، تولید آرتمیزنین نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۵ برابر افزایش داشت (۳۵ µg/g d.wt /۱۱۳). نتایج نشان داد که همبستگی معکوس و معنی داری بین بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* در رابطه با میزان تولید آرتمیزنین در تیمارهای مختلف نانو کبالت وجود دارد. همچنین مشخص شد که افزایش میزان غلظت نانو کبالت در بازه زمانی ۷۲ ساعت و افزایش غلظت نانوکیتوزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت، باعث کاهش معنی داری در بیان ژن های *SQS* و *DBR2* شد. در مطالعه اخیر، مشخص شد که اثرات نانو ذرات مورد مطالعه، در غلظت های بالا و در بازه‌های زمانی ذکر شده با کاهش بیان ژن‌های *SQS* و *DBR2* به عنوان ژن های درگیر در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزنین، باعث افزایش میزان بیوسنتز این ماده می شوند.

کلمات کلیدی: *Artemisia annua*، آرتمیزنین، بیان ژن، نانو کبالت، نانو کیتوزان، HPLC، qRT-PCR

فهرست مطالب

مجوز بهره برداری از پایان نامه ..... ذ

چکیده ..... ر

فهرست جداول ..... ع

فهرست شکل ها ..... ف

اختصارات ..... ل

فصل اول– مقدمه و مروری بر منابع ۱

۱- مقدمه ۲

۲- مشخصات گیاهشناسی درمنه ۵

۳- رده بندی گیاهی و نام های بومی درمنه ۵

۳-۱-۱- مورفولوژی ظاهری گونهٔ *A. absinthium* ۶

۳-۱-۲- پراکنش جغرافیایی گونهٔ *A. absinthium* ۷

۳-۱-۳- ترکیبات شیمیایی موجود در گونهٔ *A. absinthium* ۷

۳-۱-۴- ویژگی های اکولوژیکی گونهٔ *A. absinthium* ۷

۳-۲-۱- مورفولوژی ظاهری گونهٔ *A. annua* ۸

۳-۲-۲- پراکنش جغرافیایی گونهٔ *A. annua* ۹

۳-۲-۳- ترکیبات شیمیایی گونهٔ *A. annua* ۹

۳-۲-۴- ویژگی های اکولوژیکی گونهٔ *A. annua* ۹

۴- متابولیت های اولیه و ثانویه ۱۰

۴-۱- مشکلات تولید مستقیم متابولیت های ثانویه از گیاهان ۱۱

۴-۲- دسته بندی متابولیت های ثانویه ۱۱

۴-۲-۱- ترپن ها ۱۲

۴-۲-۲- سزکویی ترپن ۱۴
۴-۳- ساختمان شیمیایی آرتمیزنین ۱۴
۵- کاربرد و خواص دارویی آرتمیزنین ۱۵
۶- محل تولید آرتمیزنین ۱۷
۷- سنتز آرتمیزنین ۱۸
۸-کشت سوسپانسیون ۲۴
۸-۱- کاربردهای کشت سوسپانسیون سلولی ۲۷
۸-۲- مراحل کشت سلول های گیاهی ۲۸
۸-۳- راه های افزایش محصول در کشت سلولی ۳۰
۹-تحریک تولید متابولیت های ثانویه ۳۲
۹-۱- الیسیتورها (محرک ها) ۳۲
۱۰- نانو ذرات و خواص آن ۳۵
۱۰-۱- نانوفناوری در حوزهٔ کشاورزی ۳۶
۱۰-۱-۱- نانو کیتوزان و کاربردهای آن در کشاورزی ۳۷
۱۰-۱-۲- کبالت و کاربردهای آن در کشاورزی ۴۰
۱۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۴۲
۱۲- واکنش Real-Time PCR ۴۳
۱۲-۱- مزایا و محدودیت های روش Real-Time PCR ۴۴
۱۲-۲- روش های تعیین کمیت با Real time PCR ۴۵
۱۳- مروری بر تحقیقات انجام شده جهت افزایش تولید آرتمیزنین ۴۶
۱۳-۱- مطالعات انجام شده روی گیاه درمنه در داخل ایران ۵۰

۱۴- اهمیت پژوهش ۵۱

فصل دوم– مواد و روش ها ۵۲

۱- آماده سازی مواد گیاهی و آزماش های کشت بافت ۵۳

۱-۱- تهیه بذرهای گیاهی ۵۳

۱-۱-۱- ضد عفونی کردن بذرها ۵۳

۱-۲- استریل کردن آب و وسایل ۵۳

۱-۳- کشت بذرها و تهیه گیاهچه های درون شیشه ۵۴

۱-۴- تهیه و کشت ریزنمونه از گیاهچه های درون شیشه ۵۴

۱-۵- تهیه هورمون های تنظیم کنندهٔ رشد گیاهی ۵۵

۱-۶- تهیه محیط کشت ۵۵

۱-۷- بررسی صفات مختلف رشدی در مرحلهٔ تولید کالوس ۵۶

۱-۸- کشت سوسپانسیون ۵۷

۱-۸-۱- رسم منحنی رشد سوسپانسیون سلولی ۵۸

۱-۸-۲- اندازه گیری زنده مانی سلول ها ۵۹

۱-۸-۳- تهیه سوسپانسیون سلولی جهت اعمال الیسیتورها ۶۰

۱-۹- اعمال الیسیتورها برای تحریک سازی سوسپانسیون سلولی ۶۰

۱-۹-۱- تهیه استوک نانو مواد ۶۱

۱-۹-۲- تثبیت نمونه ها ۶۱

۱-۱۰- محاسبهٔ میزان آرتمیزنین با روش HPLC و نحوهٔ عصاره گیری ۶۲

۱-۱۰-۱- تهیه مادهٔ استاندارد ۶۳

۱-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری آزمایش های فیزیولوژیکی ۶۳

۲- آزمایش های مولکولی ۶۳
۲-۱- استخراج RNA با استفاده از محلول RNX-PLUS ۶۳
۲-۲- غلظت سنجی و تعیین کیفیت RNA ۶۵
۲-۲-۱- UV اسپکتروفتومتری ۶۵
۲-۲-۲- الکتروفورز ژل آگارز ۶۵
۲-۳- تیمار RNAها با آنزیم DNase 1 ..... ۶۶
۲-۴- واکنش RT-PCR ۶۷
۲-۵- طراحی آغازگرهای واکنش Real Time PCR ۶۸
۲-۵-۱- واکنش Quantitative RT-PCR ۷۰
۲-۶- آنالیز واکنش qRT-PCR ۷۱
فصل سوم– نتایج ۷۳
۱- نتایج حاصل از آزمایش های فیزیولوژیکی ۷۴
۱-۱- کشت بذر و تهیه گیاهچه ۷۴
۱-۲- کشت ریزنمونه و بررسی صفات مختلف رشدی ۷۴
۱-۳- گونهٔ *A. annua* ۷۵
۱-۳-۱- صفت کالوس زایی و وزن تر کالوس ۷۵
۱-۳-۲- صفات تعداد و طول ساقه ۹۳
۱-۳-۳- صفات تعداد و طول ریشه ۱۰۲
۱-۴- گونهٔ *A. absinthium* ۱۱۴
۱-۴-۱- صفت کالوس زایی و وزن تر کالوس ۱۱۴
۱-۴-۲- صفات تعداد و طول ساقه ۱۳۱

۱-۴-۳- صفات تعداد و طول ریشه ۱۳۹
۱-۵- انتخاب کالوس و استقرار سوسپانسیون سلولی ۱۴۲
۱-۶- بررسی رشد سلول ها در محیط کشت مایع ۱۴۴
۱-۷- بررسی زنده مانی سلول ها ۱۴۶
۱-۷-۱- رنگ آمیزی با FDA ۱۴۶
۱-۷-۲- تست فعالیت تنفسی با احیا نمک TTC ۱۴۶
۱-۸- بررسی میزان تولید آرتمیزنین توسط HPLC ۱۴۸
۱-۸-۱- رسم منحنی استاندارد ۱۴۸
۱-۸-۲- مقدار تولید آرتمیزنین درون سلولی ۱۴۸
۱-۸-۳- بررسی تولید آرتمیزنین در اثر تحریک با نانو کبالت ۱۴۹
۲- نتایج حاصل از آزمایش های مولکولی ۱۵۳
۲-۱- طراحی آغازگر ۱۵۳
۲-۲- استخراج RNA ۱۵۶
۲-۳- حذف DNA ژنومی با استفاده از DNase I ۱۵۶
۲-۴- واکنش Reverse Transcriptase PCR ۱۵۹
۲-۵- واکنش Quantitative RT-PCR ۱۵۹
۲-۵-۱- نانو کبالت ۱۶۳
الف) ژن *SQS* ۱۶۴
ب) ژن *DBR2* ۱۶۶
۲-۵-۲- نانو کیتوزان ۱۶۷
الف) ژن *SQS* ۱۶۷

ب) ژن *DBR2* ۱۷۰

فصل چهارم– نتیجه گیری نهایی وبحث ۱۷۲

۱- بررسی میزان آرتمیزنین (نتایج حاصل از HPLC) ۱۷۳

۱-۱- بررسی رابطه میزان آرتمیزنین با بیان ژن ها در تیمار نانو کبالت ۱۷۴

۲- بررسی میزان بیان ژن ها (نتایج حاصل از qRT-PCR) ۱۷۵

۲-۱- الیسیتور نانو کبالت ۱۷۵

۲-۲- الیسیتور نانو کیتوزان ۱۷۶

۳- پیشنهادها ۱۷۸

منابع ۱۸۰

فهرست جداول

جدول (۱-۱) رده‌بندی گیاهی دو گیاه ۵

جدول (۱-۲) طبقه بندی متابولیت های ثانویه ۱۰

جدول (۱-۳) فهرستی از مهمترین و گرانترین داروها ۲۵

جدول (۱ -۴) طبقه بندی الیسیتورهای زنده ۳۴

جدول(۲-۱) تیمارهای مختلف هورمونی (میلی‌گرم در لیتر) جهت القای کالوس ۵۶

جدول (۲-۲) تیمارهای مختلف هورمونی (میلی‌گرم در لیتر) جهت تهیه سوسپانسیون سلولی ۵۷

جدول (۲-۳) تیمارهای مختلف هورمونی گونه *A. absinthium* ۵۷

جدول (۲-۴) تیمارهای گوناگون مقدار آنزیمDNase 1 ۶۶

جدول (۲-۵) مواد مورد نیاز برای واکنش RT-PCR ۶۷

جدول(۲-۶) برنامهٔ PCR جهت آزمودن سنتز cDNAها ۶۸

جدول (۲-۷) ترکیب بهینهٔ مورد استفاده در PCR برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه ۶۹

جدول (۲-۸) برنامهٔ PCR برای آزمودن آغازگرهای Real Time PCR ۶۹

جدول (۲-۹) مواد لازم جهت انجام Real time PCR ۷۰

جدول (۲-۱۰) برنامهٔ Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن‌ها ۷۱

جدول (۳-۱) تجزیه واریانس صفات مختلف رشدی برای گونهٔ *A. annua* ۷۶

جدول (۳-۲) مقایسه میانگین برای عامل نوع ریزنمونه (گونهٔ *A. annua*) ۷۷

جدول (۳-۳) مقایسه میانگین برای عامل‌های NAA و BAP (گونهٔ *A. annua*) ۷۸

جدول (۳-۴) مقایسه میانگین چهار عامل گونهٔ *A. annua* ۷۹

جدول (۳-۵) رنگ و کیفیت کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مختلف ۸۸

جدول (۳-۶) مقایسه میانگین نوع قند و هورمون BAP (گونهٔ *A. annua*) ۹۳

جدول (۳-۷) مقایسه میانگین نوع ریزنمونه و هورمون NAA (گونهٔ *A. annua*) ۹۵

جدول (۳-۸) مقایسه میانگین نوع ریزنمونه و هورمون BAP (گونهٔ *A. annua*) ۹۶

جدول (۳-۹) نتایج تحقیقات سایر محققین در مورد تأثیر هورمون‌ها ۹۹

جدول (۳-۱۰) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۰

جدول (۳-۱۱) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون BAP (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۰

جدول (۳-۱۲) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA و قند (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۲

جدول (۳-۱۳) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA، BAP و قند (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۳

جدول (۳-۱۴) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون BAP، قند و ریزنمونه (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۷
جدول (۳-۱۵) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA، قند و ریزنمونه (گونهٔ *A. annua*) ۱۰۹
جدول (۳-۱۶) تجزیه واریانس صفات مختلف رشدی برای گونهٔ *A. absinthium* ۱۱۳
جدول (۳-۱۷) مقایسه میانگین چهار عامل نوع BAP (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۱۴
جدول(۳-۱۸) رنگ و کیفیت کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مختلف در گیاه *A. absinthium* ۱۲۴
جدول (۳-۱۹) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA، قند و ریزنمونه (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۲
جدول (۳-۲۰) مقایسه میانگین برای عامل نوع ریزنمونه (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۶
جدول (۳-۲۱) مقایسه میانگین برای عامل نوع ریزنمونه و قند (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۶
جدول (۳-۲۲) مقابسه میانگین سطوح مختلف هورمون NAA (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۸
جدول (۳-۲۳) مقایسه میانگین سطوح مختلف هورمون BAP (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۸
جدول (۳-۲۴) مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون BAP و NAA (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۳۸
جدول (۳-۲۵) تجزیه واریانس میزان رشد سوسپانسیون سلولی در تیمارهای مختلف هورمونی ۱۴۳
جدول (۳-۲۶) تجزیه واریانس جذب فورموزان (در طول یک ماه) ۱۴۷
جدول (۳-۲۷) مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نانو کبالت در تولید آرتمیزنین ۱۵۰
جدول (۳-۲۸) مقایسه میانگین تیمارهای زمانی مختلف جهت اعمال نانو کبالت ۱۵۱
جدول (۳-۲۹) مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و تیمارهای زمانی مختلف جهت تولید آرتمیزنین ۱۵۱
جدول (۳-۳۰) اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR ۱۵۴
جدول (۳-۳۱) ترکیبات مورد نیاز برای رفع آلودگی ژنومی از RNA با آنزیم DNase1 ۱۵۸
جدول (۳-۳۲) میزان ct و efficiency ۱۶۲
جدول (۳-۳۳) مقایسه میانگین عوامل مورد مطالعه برای بیان ژن *SQS* در اثر تحریک با نانو کبالت ۱۶۳
جدول (۳-۳۴) ضرایب همبستگی صفت کیفی (میزان آرتمیزنین) و ژن‌های مورد مطالعه ۱۶۴
جدول (۳-۳۵) مقایسه میانگین عوامل مورد مطالعه برای بیان ژن *SQS* و *DBR2* در اثر تحریک با نانو کیتوزان ۱۶۸

فهرست شکل‌ها

شکل (۱-۱) گونهٔ *A. absinthium* ۶

شکل (۱-۲) برگ‌های گونهٔ *A. absinthium* ۶

شکل (۱-۳) گل‌های گونهٔ *A. absinthium* ۶

شکل (۱-۴) بوتهٔ گونهٔ *A. annua* ۸

شکل (۱-۵) برگ‌های گونهٔ *A. annua* ۸

شکل (۱-۶) گل‌های گونهٔ *A. annua* ۸

شکل (۱-۷) ساختمان یک واحد ایزوپرن ۱۲

شکل (۱-۸) مسیر سنتز ایزوپرنوئیدها ۱۳

شکل (۱-۹) ساختمان شیمیایی آرتمیزنین ۱۵

شکل (۱-۱۰) ساز وکار عمل آرتمیزنین در از بین بردن عامل بیماری مالاریا ۱۷

شکل (۱-۱۱) ساختمان تارهای تراوشی ۱۸

شکل (۱-۱۲) اولین مرحله سنتز آرتمیزنین ۲۰

شکل (۱-۱۳) سزکویی‌ترپن‌سیکلازهای گیاه*A. annua* ۲۱

شکل (۱-۱۴) آنزیم‌ها و مواد حد واسط در سنتز آرتمیزنین ۲۲

شکل (۱-۱۵) مسیر نهایی تشکیل آرتمیزنین و محصولات جانبی آن ۲۴

شکل (۱-۱۷) مراحل کشت سلول ۲۹

شکل(۱-۱۹) ساختار شیمیایی کیتوزان ۳۸

شکل (۲-۱) بذرهای *annua* و *absinthium* ۵۳

شکل(۲-۲) گیاهچه‌های جوان *A. annua* و *A. absinthium* ۵۴

شکل (۲-۳) ریزنمونه‌های برگ ، ریشه و ساقه‌های کشت شده ۵۵

شکل (۲-۴) نمونه سوسپانسیون سلولی رنگ گرفته شده بعد از ۲۴ ساعت ۶۰

شکل (۲-۵) کشت سوسپانسیون سلولی جهت اعمال الیسیتورها ۶۰

شکل (۲-۶) جدا سازی سلول‌ها با عبور محتوای هر ارلن از صافی‌های فلزی ۶۲

شکل (۳-۱) بذرهای گونهٔ *A.absinthium* (a) وگونهٔ *A. annua* (b). بذرهای *A. annua* ۷۴

شکل (۳-۲) آزمون t-test نوع قند برای صفات مختلف رشدی در گیاه *A. annua* ۷۵

شکل (۳-۳) مقایسه میانگین انواع ریزنمونه برای وزن تر کالوس ۷۷

شکل (۴-۳) مقایسه میانگین اثر متقابل NAA و BAP برای وزن تر کالوس ۷۸

شکل (۳-۵) روند تشکیل کالوس ۸۷
شکل (۳-۶) تغییر رنگ کالوس ۸۸
شکل (۳-۷) انواع کالوس در تیمارهای مختلف هورمونی ۹۲
شکل(۳- ۸) انواع رنگ کالوس‌های تشکیل شده ۹۲
شکل (۳-۹) مقایسه میانگین بین ریزنمونه‌ها برای تولید ساقه و ریشه در گونهٔ *A. annua* ۹۴
شکل(۳-۱۰) تشکیل نو ساقه ۹۵
شکل (۳-۱۱) اثر متقابل NAA و BAP برای تعداد نو ریشه و نو ساقه در گونهٔ *A. annua* ۹۸
شکل (۳-۱۲) ساقه های تشکیل شده در تیمارهای مختلف هورمونی گونهٔ *A. annua* ۱۰۱
شکل (۳-۱۳) ریشه‌های القا شده گونهٔ *A. annua* ۱۱۲
شکل (۳-۱۴) مقایسه میانگین NAA و BAP برای صفت طول ریشه گیاه *A. annua* ۱۱۲
شکل (۳-۱۵) آزمون t-test برای صفت‌های مختلف رشدی گیاه *A. absinthium* ۱۲۳
شکل (۳-۱۶) مقایسه میانگین اثر متقابل NAA و BAP برای صفت وزن تر کالوس در گونهٔ *A. absinthium* ۱۲۳
شکل (۳-۱۷) بررسی نوع ریزنمونه برای صفت وزن تر کالوس در گیاه *A. absinthium* ۱۲۴
(شکل ۳-۱۸) تشکیل نو ساقه در هفته اول ۱۳۱
شکل (۳-۱۹) مقایسه میانگین NAA و BAP برای دو صفت تعداد نو ساقه و نو ریشه در گیاه *A. absinthium* ۱۳۴
شکل (۳-۲۰) مقایسه میانگین نوع ریزنمونه برای تعداد نو ساقه و نو ریشه در گیاه *A. absinthium* ۱۳۷
شکل (۳-۲۱) تشکیل نو ریشه در سه بافت ریشه، برگ و ساقه (گونهٔ *A. absinthium*) ۱۴۰
شکل (۳-۲۲) مقایسه میانگین NAA وBAP برای صفت طول ریشه در گیاه *A. absinthium* ۱۴۱
شکل (۳-۲۳) کالوس‌های انتخاب شدهٔ *A. annua* ۱۴۳
شکل (۳-۲۴) مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی بهینه سازی سوسپانسیون سلولی گونهٔ *A. annua* ۱۴۴
شکل (۳-۲۵) منحنی رشد سلول‌ها ۱۴۵
شکل(۳-۲۶) سوسپانسیون سلولی روز اول و سی ام ۱۴۵
شکل (۳-۲۷) سلول‌ها در زیر میکروسکوپ ۱۴۶
شکل (۳-۲۸) مقایسه میانگین جذب فورموزان طی ۳۰ روز ۱۴۷
شکل (۳-۲۹) کروماتوگرام جداسازی ماده استاندارد آرتمیزنین در دستگاه HPLC ۱۴۸
شکل (۳-۳۰) میزان تولید آرتمیزنین داخل سلولی طی ۳۶ روز ۱۴۹
شکل (۳-۳۱) بررسی غلظت‌های ۰/۲۵، ۲/۵ و ۵ (mg/l) نانو کبالت بر میزان تولید آرتمیزنین ۱۴۹
شکل (۳-۳۲) بررسی تیمارهای زمانی ۱۵۲